

Estrategias bioanalíticas en estudios metalómicos de fármacos de platino

M^a Milagros Gómez Gómez, Estefanía Moreno Gordaliza, M^a Luz Mena Fernández, M^a Antonia Palacios Corvillo, Benito Cañas Montalvo

Resumen: En este artículo se muestra el potencial que presentan las modernas estrategias bioanalíticas en estudios metalómicos de fármacos de platino. La combinación de técnicas de separación multidimensionales cromatográficas y/o electroforéticas con la espectrometría de masas atómica ICP-MS y molecular ESI-MS/MS se presenta como una valiosa alternativa en este tipo de estudios.

Palabras clave: Bioanálisis, metalómica, fármacos de Pt, cáncer, espectrometría de masas, separaciones multidimensionales.

Abstract: This article demonstrates the potential of modern bioanalytical strategies used in metallomic studies of platinum drugs. The combination of multidimensional chromatographic and/or electrophoretic separation techniques with atomic (ICP-MS) and molecular (ESI-MS/MS) mass spectrometry is presented as a valuable alternative in this type of studies.

Keywords: Bioanalysis, metallomics, platinum drugs, cancer, mass spectrometry, multidimensional separations.

Introducción

Ciertos complejos de platino son utilizados extensamente en el tratamiento de tumores sólidos. Así el cisplatino, (cis-diaminocloroplatino) se emplea en el tratamiento de cáncer de pulmón, testículos, ovarios, vejiga, cuello, cabeza, bazo y cérvix.¹ Puesto que los tumores se caracterizan por un aumento incontrolado de la proliferación celular, el ADN suele ser la diana de los fármacos antitumorales. El mecanismo de acción del cisplatino y de moléculas análogas implica la interacción coordinativa covalente del platino con las bases nitrogenadas del ADN, fundamentalmente guanina y adenina, produciendo

un entrecruzamiento en la misma cadena, o incluso, intercadena.¹ Los aductos de platino formados inciden en los procesos de replicación y transcripción, produciendo, finalmente, la muerte celular por apoptosis.² La clave del éxito en los tratamientos de quimioterapia estriba en destruir las células malignas sin causar un daño irreparable a las sanas.

Además de la reactividad descrita entre los fármacos del platino y las bases del ADN, la presencia de Pt (II) les proporciona la capacidad de unirse (principalmente a través de los grupos tiol) a otras biomoléculas como las proteínas del torrente sanguíneo (albúmina, transferrina, hemoglobina), los fosfolípidos de las membranas celulares, los aminoácidos cisteína y metionina, el oligopéptido glutatión (GSH) o las metalotioneínas (MTs).³ Entre las consecuencias más importantes de la formación de estos complejos Pt-biomolécula cabe destacar la resistencia al tratamiento debida al desarrollo de mecanismos de detoxificación por la reacción con MTs o GSH, así como los efectos tóxicos que aparecen durante el tratamiento (el principal y más limitante es la nefrotoxicidad), por lo que, a pesar de la potente actividad antitumoral del cisplatino, su uso clínico está limitado.

Aunque el mecanismo molecular de la nefrotoxicidad no está completamente establecido, se sabe que el cisplatino ocasiona daños estructurales en las células epiteliales de los túbulos del riñón con pérdida del borde en cepillo.⁴ Estos daños son dependientes de la dosis, por lo que su administración máxima está limitada a 100 mg/m².

Con objeto de disminuir los efectos tóxicos del cisplatino, y/o buscar compuestos alternativos que mejoraran o complementaran el espectro de su acción terapéutica, se desarrollaron otros fármacos análogos como el carboplatino (cis-diamino (1,1-ciclobutanodicarboxilato) platino(II)) y el oxaliplatino (*trans*-L-1,2-diaminociclohexano oxalatoplatino (II)). Estos compuestos son activos frente al mismo tipo de cánceres y en ocasiones eficaces frente a tumores resistentes al cisplatino, y permiten dosis de hasta 300 mg/m² y 150 mg/m² de carboplatino y oxaliplatino respectivamente.⁵ No obstante, estos fármacos presentan otros efectos secundarios



M^a M. Gómez Gómez



E. Moreno Gordaliza



M^a L. Mena Fernández



M^a A. Palacios Corvillo



B. Cañas Montalvo

Universidad Complutense de Madrid. Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias Químicas.
Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid.
C-e: mmgomez@quim.ucm.es

Recibido: 15/06/2011. Aceptado: 02/12/2011.

como mielosupresión y neuropatías, y su eficacia en general es inferior. Actualmente, cabe destacar tres compuestos de Pt (II) que ofrecen un comportamiento prometedor: el nedaplatino (*cis*-diaminoglicolato-*O*, *O'*-platino (II)), aprobado para uso clínico en Japón, el lobaplatino (*cis*-1,2-diaminociclobutanoglicolato-*O*, *O'*-platino (II)), autorizado en China y el picoplatino (*cis*-aminodichloro (2-metilpiridina) platino (II)), en fase III de ensayos clínicos. La Figura 1 muestra la estructura química de estos fármacos.

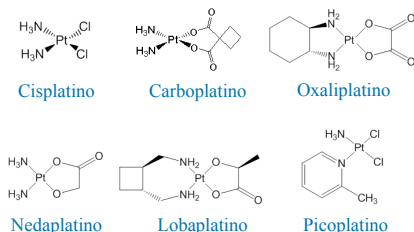


Figura 1. Estructura de los fármacos de platino más importantes.

Si se echa la vista atrás, el progreso en las terapias oncológicas con fármacos de platino ha sido exponencial desde la aprobación clínica del cisplatino en 1978. Sin embargo, hay todavía una falta de conocimiento profundo acerca del comportamiento de estos fármacos en el organismo, tanto de sus mecanismos de acción como de sus efectos tóxicos. Desde que estos fármacos entran en el torrente sanguíneo, tras su administración intravenosa, hasta que penetran en la célula y causan el efecto citotóxico, interaccionan con gran variedad de biomoléculas. Estas interacciones tienen que ver con fenómenos de transporte, de traspaso de la membrana celular, fenómenos de resistencia inducida e incluso con disfuncionalidades en ciertas biomoléculas que conducen a toxicidad.³ Por tanto, es de interés ahondar en el conocimiento de su mecanismo de actuación, así como en el análisis de las especies formadas por posibles interacciones entre estos fármacos, o sus derivados hidrolizados, y las diferentes biomoléculas que se encuentran en el organismo. De hecho, los avances logrados en los últimos años en análisis bio-inorgánico en el área de la metalómica, han contribuido de forma significativa a caracterizar la interacción de estas drogas con el ADN y con biomoléculas presentes en las células de la sangre, como la hemoglobina;⁶ en el plasma sanguíneo, como albúmina, transferrina e inmunoglobulinas;⁷ o en distintos componentes celulares, como el citoesqueleto, la membrana plasmática, vesículas³ y proteínas citoplasmáticas.⁸

Metodologías analíticas en metalómica

La metodología para el análisis bio-inorgánico en el campo de la metalómica ha evolucionado de forma notoria en los últimos años gracias al desarrollo de nuevos instrumentos de espectrometría de masas y a su acoplamiento a técnicas separativas de gran resolución, aplicable tanto a la caracterización elemental como a la caracterización molecular de las especies administradas y/o formadas en el medio biológico.⁹ Mediante esta combinación de técnicas ha sido posible solucionar los principales problemas que entrañan estos análisis: concentraciones muy

bajas de los complejos formados, matrices muy complejas, transformación de especies, ruptura de los complejos metal-biomolécula, etc. Se requieren además métodos de preparación de la muestra eficaces, pero poco agresivos, con capacidad para purificar y preconcentrar las especies de interés sin romper los complejos que forman estos fármacos con las biomoléculas.

Cuando los complejos a estudiar están formados por metales y proteínas, la metodología analítica desarrollada se basa en la adaptación de la empleada hoy en día en el campo de la proteómica, constituyendo la base de la metodología metaloproteómica.¹⁰ Las técnicas utilizadas son, fundamentalmente, de separación de muestras complejas como la electroforesis en gel mono- o bi-dimensional, o la combinación de distintas separaciones cromatográficas en lo que se ha dado en llamar cromatografía multidimensional. La cromatografía de exclusión por tamaños (SEC)¹¹ es una técnica adecuada para el fraccionamiento de proteínas debido a la recuperación elevada que se obtiene. Sin embargo, la resolución obtenida no es especialmente buena, y cada una de las fracciones recogidas de una columna SEC puede contener un número indeterminado de proteínas si se trata de muestras biológicas de elevada complejidad. A pesar de esto, puede ser muy útil para desalar muestras, para resolver mezclas simples o como fraccionamiento previo a otras separaciones. No obstante, los acoplamientos de separaciones cromatográficas más utilizados combinan resolución con ortogonalidad, tal es el caso de la combinación de intercambio iónico con fase inversa.¹²

La espectrometría de masas molecular (MS) con técnicas de ionización blandas como electrospray (ESI) o desorción/ionización por láser asistida por una matriz (MALDI) poseen un potencial analítico considerable en la determinación estructural de los complejos formados en metaloproteómica, ya que en muchos casos permiten que la estructura de las proteínas y los enlaces metal-biomolécula se conserven.⁹

En los últimos años el empleo de la espectrometría de masas elemental con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) como detector selectivo elemental y su acoplamiento a las técnicas cromatográficas, ha supuesto un gran avance en metalómica, principalmente debido a su elevada sensibilidad y carácter multi-elemental, aportando información tanto del metal o metaloide como de otros no-metales de gran importancia biológica como azufre o fósforo.⁹ Se han realizado con éxito separaciones bidimensionales de biomoléculas presentes en el extracto proteico de la fracción citosólica de riñón de ratas tratadas con cisplatino, carboplatino y oxaliplatino. Esto se ha logrado mediante la combinación de SEC y cromatografía de intercambio iónico (IEC) con preconcentración en línea (en cabeza de columna) y acoplamiento a ICP-MS,¹³ encontrándose que los fármacos pueden estar unidos a una gran variedad de proteínas. Así se pone de manifiesto la necesidad de separaciones que proporcionen un gran poder de resolución, tales como μ HPLC, previo a la elucidación estructural de los complejos fármaco-proteína formados. En este sentido el acoplamiento μ HPLC-ICP-MS es una herramienta de gran ayuda para la detección específica y cuantificación de las biomoléculas con platino, cuya estructura se determina en paralelo mediante μ HPLC-ESI-MS.⁹

La baja concentración de los complejos metal-biomolécula en las muestras biológicas hace necesario el empleo de procedimientos de preconcentración previos al análisis. Entre los métodos más utilizados cabe destacar la evaporación de

disolventes a vacío mediante liofilización o *speed-vac*, la ultrafiltración por tamices moleculares o la concentración en cabeza de columna previamente a la separación cromatográfica.¹⁰ La focalización en línea se puede realizar mediante IEC o mediante cromatografía en fase inversa (RPC), con elevados factores de preconcentración y baja manipulación de la muestra. Con frecuencia, las fracciones cromatográficas concentradas presentan un elevado contenido salino, que es incompatible con ESI-MS, por lo que las fracciones deben ser desaladas mediante diálisis, ultrafiltración o microcolumnas de extracción en fase sólida.

En general, los procedimientos mencionados han de mantener la integridad de los complejos originales metal-biomolécula. Por ello, se requiere el empleo de inhibidores de proteasas, el control riguroso de las condiciones experimentales de pH, temperatura, salinidad, tiempo de almacenamiento de las muestras y conocer el efecto de los reactivos del procedimiento analítico para evitar la ruptura de los complejos, la transformación de las especies y la desnaturalización o agregación de proteínas.

Acumulación de cisplatino, carboplatino y oxaliplatino en organismos vivos y su distribución en fracciones celulares

Los estudios se realizaron en ratas Wistar con dosis farmacológicas de cisplatino, carboplatino y oxaliplatino inyectadas por vía intraperitoneal. El platino acumulado en los órganos que en principio son susceptibles a un mayor daño, se determinó mediante ICP-MS. Los órganos en estudio fueron el riñón (el cisplatino produce nefrotoxicidad), hígado (órgano de acumulación), cerebro (el platino puede atravesar la barrera cerebral) y oído interno (el cisplatino produce ototoxicidad).¹⁴ Las principales conclusiones de los resultados de acumulación obtenidos en los diferentes órganos fueron las siguientes: el riñón fue el órgano que más platino acumuló a los tres días del tratamiento seguido por el hígado, el oído y el cerebro. Esto ocurrió independientemente del fármaco administrado. El máximo de acumulación para todos los fármacos se obtuvo a los siete días; a partir de este tiempo el contenido en platino empieza a disminuir en todos los órganos. Se observó que la capacidad de acumulación de los tres fármacos no es la misma. Así, las ratas tratadas con oxaliplatino presentaron mayor acumulación de platino en relación con la dosis administrada, seguidas de las tratadas con cisplatino y carboplatino. El hecho de que el oxaliplatino no sea el fármaco que en principio produce más toxicidad hace que no se pueda establecer una relación directa entre acumulación del elemento y toxicidad.

Los estudios realizados sobre la acumulación del cisplatino en diferentes partes del riñón de ratas muestran una acumulación unas ocho veces superior en la corteza en comparación con la médula renal. Estos datos concuerdan con el hecho de que, en la filtración del cisplatino en el riñón, la exposición al fármaco es nueve veces superior en el túbulo proximal respecto a la de la médula renal y del túbulo distal y colector. Como resultado, la corteza es la zona del riñón que presenta mayor daño, y por lo tanto en la que se han de centrar los estudios metalómicos.

Los estudios de distribución de los tres fármacos en diferentes fracciones celulares (núcleo, mitocondrias y citosol) y

subfracciones citosólicas de los distintos órganos, se realizaron mediante la preparación de extractos de tejidos en 10 mM Tris-HCl + 25 mM NaCl y posterior fraccionamiento por métodos de ultracentrifugación y ultrafiltración. En las distintas fracciones y subfracciones se analizó el contenido total de platino por ICP-MS. La distribución del platino en cada una de las fracciones celulares y citosólicas ofrece resultados muy similares para los tres fármacos. En riñón, la fracción citosólica, y en concreto la fracción inferior a 50 kDa, es la que presenta un mayor contenido del elemento. Por tanto esta fracción es la más interesante para abordar los estudios de interacción Pt-biomoléculas con objeto de descubrir qué compuestos podrían estar más relacionados con la nefrotoxicidad producida por platino. Precisamente, en este intervalo de masas se encuentran biomoléculas de notable interés como el GSH o las MTs, moléculas relacionadas con los mecanismos de detoxificación.

Estudio de la reacción *in vitro* entre cisplatino y biomoléculas citosólicas o proteínas del suero sanguíneo

El GSH es el principal responsable de mantener el estado redox en el interior celular, con un papel fundamental en la defensa contra el estrés oxidativo. Es también un importante

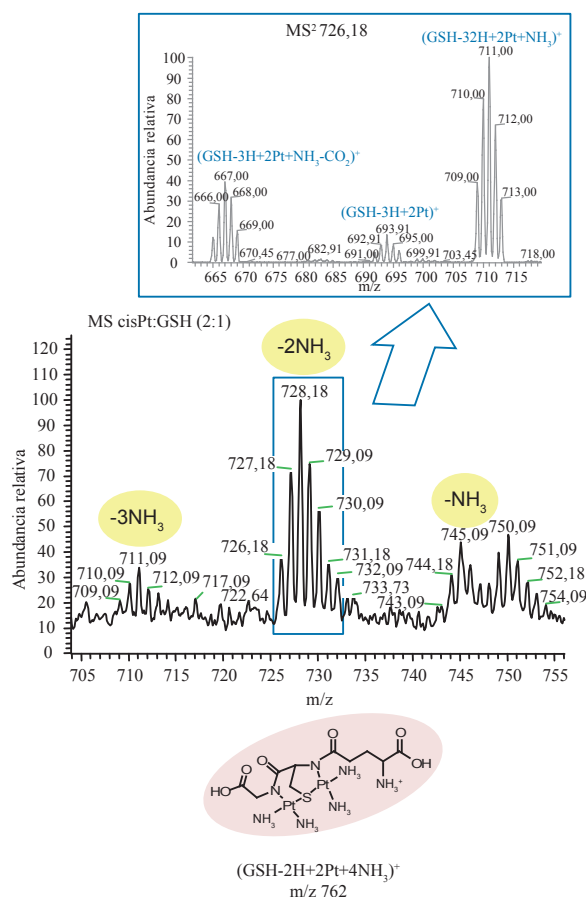


Figura 2. Espectro ESI-MS de una disolución de cisplatino 100 μ M incubada con GSH 50 mM durante 48 h, y espectro MS² del ión precursor a m/z 726.18–732.09, que corresponde a la estructura propuesta [GSH-3H+2Pt+2NH₃].

destoxificador de agentes carcinogénicos, por lo que cuando se encuentra en concentraciones altas en algunos tumores puede incrementar la resistencia a la quimioterapia. El cociente entre la especie reducida y la oxidada GSH/GSSG es un factor importante en la protección contra la apoptosis, proceso deseable como efecto de la administración de fármacos anticancerígenos como el cisplatino.⁵

Es sabido que el cisplatino en medio fisiológico puede encontrarse en su forma molecular original, en forma de dímero, o sustituir los cloros de su molécula por moléculas de agua u OH- dando lugar a diversos acuocomplejos que son las formas más reactivas para asociarse a las proteínas.

Para estudiar la reactividad del cisplatino con GSH, se incubaron ambas moléculas en las concentraciones farmacológicas Pt:GSH, que cabe esperar en el citosol celular (1:500). Posteriormente, la separación y detección de los aductos formados, se realizó mediante SEC-ICP-MS. Estos estudios han mostrado la formación, con distintas cinéticas, de diversos complejos cisplatino-GSH.⁸ No obstante, siempre permanece en el medio de reacción una cantidad

importante de distintas especies de cisplatino libre, que demuestra la reactividad limitada con GSH. El análisis mediante nESI-MS/MS de los complejos formados permitió la caracterización estructural de un complejo con estequiometría cisplatino:GSH 2:1 (Figura 2).⁸

Otras biomoléculas importantes del citosol celular con una gran capacidad de destoxificación de posibles contaminantes metálicos, son las MTs. Estas proteínas son capaces de coordinar metales tóxicos a sus múltiples residuos cisteínicos, desplazando de su estructura otros metales previamente coordinados. Se incubaron MTs que contenían Zn y Cd con 10 μ M de cisplatino en la proporción cisplatino:MTs 1:10 y las muestras fueron analizadas mediante SEC-ICP-MS. De forma análoga al estudio anterior, los resultados obtenidos han demostrando la gran afinidad que presentan estas proteínas por el cisplatino.⁸ En tan sólo 4h todo el fármaco se incorporó a las MTs, desplazando al Zn de las mismas, pero no al Cd (Figura 3). Este hecho pone de manifiesto la mayor estabilidad de los complejos de Pt²⁺ y Cd²⁺ con los residuos cisteínicos, en comparación con los formados con el Zn²⁺. En la incubación simultánea de cisplatino con GSH y MTs, como era de esperar, predomina el complejo cisplatino:MTs, aun en presencia de un gran exceso de GSH. Asimismo, citosoles de riñón de ratas tratadas con cisplatino y citosoles de ratas no tratadas que fueron incubados con el fármaco, muestran la presencia de los complejos anteriormente mencionados, tanto con GSH como con MTs, lo que indica una formación similar de los aductos biomolécula-cisplatino *in vivo* e *in vitro*.⁸

Para conocer la reactividad del cisplatino con las proteínas de la sangre que están implicadas en los procesos de transporte del fármaco al interior de las células, se realizaron incubaciones en condiciones fisiológicas de cisplatino con las proteínas de suero humano: albúmina (HSA), transferrina (TF) e inmunoglobulina G. El análisis de los aductos formados se realizó mediante cromatografía de intercambio aniónico acoplada a ICP-MS. Se observó la formación preferente del aducto cisplatino-HSA.⁷ Mucho menos intensa y más lenta fue la formación del aducto cisplatino-TF. La incubación de un suero sanguíneo humano con cisplatino corrobora que la especie platinada mayoritaria es el aducto cisPt-HSA y que esta interacción ocurre en gran extensión.

Aproximaciones proteómicas *bottom-up* y *top-down* en la caracterización estructural de proteínas ligadas a fármacos de platino

La identificación y caracterización de proteínas puede realizarse mediante dos posibles aproximaciones proteómicas conocidas como: *bottom-up* (de abajo a arriba) y *top-down* (de arriba a abajo). En la aproximación *bottom-up*, las proteínas de la muestra se separan mediante electroforesis bidimensional, y las manchas proteicas de interés se someten a digestión *in-gel* generalmente triptica. El posterior análisis de los péptidos obtenidos mediante MALDI-TOF-MS permite la identificación de la proteína sobre la base de su huella peptídica. Otra alternativa del *bottom-up* es la identificación de las proteínas a partir de los espectros de fragmentación de sus péptidos mediante ESI-MS/MS, y la asignación de las secuencias mediante búsqueda en las bases de datos de proteínas con ayuda de programas especializados. La aproximación pro-

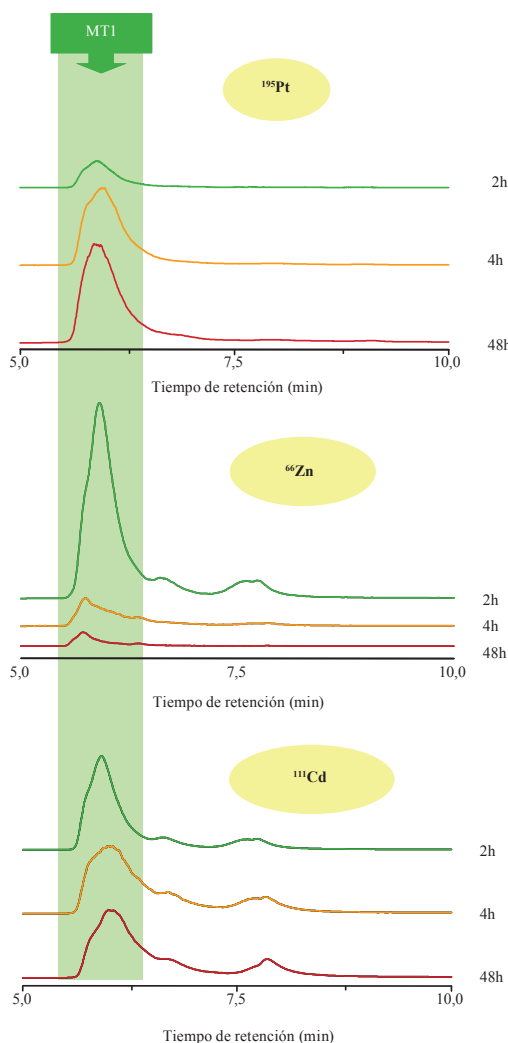


Figura 3. Cromatogramas SEC-ICP-MS de una disolución 10 μ M de MT de hígado de conejo incubada con cisplatino 1 μ M durante 2, 4 y 48 h. Iones monitorizados ¹⁹⁵Pt, ⁶⁶Zn y ¹¹¹Cd.

teómica *top-down*, consiste básicamente en la identificación de las proteínas una vez separadas mediante combinación de diferentes metodologías y sin previa digestión. Se utilizan a este efecto instrumentos de alta resolución como FTICR-MS (espectrometría de masas por resonancia ciclotrónica de iones con transformada de Fourier) acoplados a distintas fuentes de ionización, generalmente ESI. La aproximación *top-down* es menos utilizada, ya que los espectros de fragmentación obtenidos son muy complejos. Estos métodos permiten no sólo identificar las proteínas en cuestión en muestras reales, sino también los puntos de unión específicos del platino en la proteína. De hecho existe una gran actividad científica en este campo. La metodología *bottom-up* es recomendable ya que proporciona espectros de masas más fácilmente interpretables que los generados utilizando la metodología *top-down*. Además, para péptidos de masa molecular por debajo de 5000-6000 Da, la diferenciación entre iones platinados o no, es posible gracias al perfil característico del platino, que por encima de estas masas se atenúa.

Ambas metodologías se han evaluado en estudios de análisis de los productos de la incubación de cisplatino con insulina. Esta proteína es un buen modelo para el estudio debido a su tamaño (54 aminoácidos), que permite observar el perfil isotópico debido al platino en estudios *top-down* en instrumentos de espectrometría de masas de resolución media como la trampa lineal de iones (LIT). La estructura de la insulina también presenta aspectos interesantes, como es la presencia de distintos aminoácidos susceptibles de ligar platino en una molécula formada por dos cadenas polipeptídicas unidas a través de dos puentes disulfuro, y que por tanto pueden separarse en condiciones reductoras. Las incubaciones fueron realizadas en condiciones fisiológicas y analizadas mediante nESI-LIT-MS/MS. En la aproximación *top-down*¹⁵ el aná-

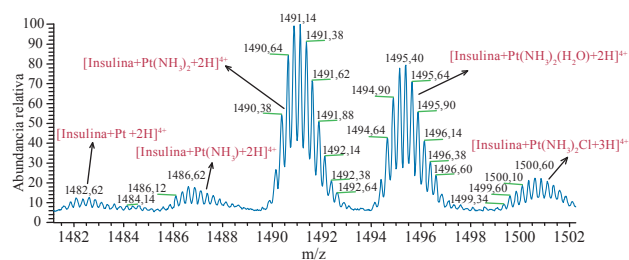


Figura 4. Espectro de masas adquirido mediante nESI LIT MS en modo de barrido zoom en el intervalo m/z 1482-1502, correspondiente a los monoadductos platinados de insulina observados en una incubación de insulina-cisplatino 1:1 tras 96 h de evolución en un medio salino a pH 7,4.

lisis preliminar mediante SEC-ICP-MS permitió detectar selectivamente los aductos de insulina-cisplatino en las incubaciones. Posteriores análisis mediante MALDI-TOF-MS y nESI-LIT-MS de las proteínas complejadas mostraron la presencia en las incubaciones de mono-, di- e incluso triaductos de platino (Figura 4). El modo *zoom scan* de la LIT presenta suficiente resolución para distinguir el perfil isotópico de los iones formados, lo que permitió localizar los iones que contenían platino (Figura 5). Los puntos de unión del platino en la insulina se identificaron mediante fragmentación disociación inducida por colisión (CID)-MSⁿ y fueron, en la cadena B, el aminoácido N-terminal y los residuos His5, His10 y Cys7.

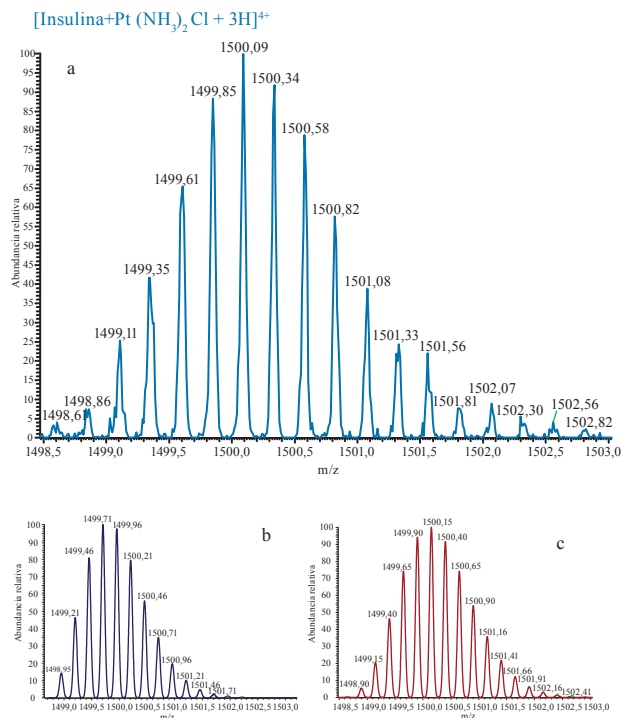


Figura 5. a) Análisis nESI-LIT MS en modo de barrido Ultrazoom, adquirido entre m/z 1498,5 y 1503,0, mostrando el perfil isotópico del aducto $[(\text{insulina}+\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}+3\text{H})^+]$, observado en una incubación de insulina-cisplatino 1:5 en TFA 0,1%, tras 96 h de evolución. Los perfiles isotópicos teóricos de péptidos que presentan la misma masa, sin y con platino, se muestran en b) y c), respectivamente, a efectos comparativos.

En el análisis *bottom-up* de los aductos cisPt-insulina el objetivo fue evaluar si las condiciones químicas de la digestión enzimática en disolución, afectan a los enlaces cisplatino-proteína.¹⁶ Los estudios se realizaron mediante nESI-LIT-MSⁿ. Se comprobó que los aductos cisplatino-insulina resisten la digestión clásica que incluye desnaturalización con urea, reducción de los puentes disulfuro con ditiotreitól (DTT), alquilación de los grupos tioles libres con yodoacetamida (IAA) y finalmente digestión con tripsina en disolución reguladora Tris-HCl durante más de doce horas. El análisis de los péptidos obtenidos mediante nESI-LIT-MSⁿ aportó, además de los puntos de unión anteriormente mencionados en la aproximación *top-down* (Figura 6), otros adicionales en la cadena A, la Cys6, Cys7 y Cys20, y en la cadena B la Cys19, demostrándose la adecuación de la aproximación *bottom-up* para el análisis de las proteínas con platino e identificación de los puntos



Figura 6. Secuencia de aminoácidos de la insulina bovina. En rojo se han marcado los aminoácidos que se han reconocido como capaces de coordinarse al platino tanto por la aproximación *top-down* como con la *bottom-up*. En azul se han resaltado los aminoácidos que ligan platino encontrados exclusivamente mediante la aproximación *bottom-up*.

de unión específicos del fármaco en una proteína. Los datos obtenidos con esta aproximación son más completos que los que se obtienen con la aproximación *top-down*, ya que los puntos de unión minoritarios del platino son más difíciles de asignar en los complejos espectros MS/MS de los aductos Pt-insulina intactos.

Cuando la proteína se incubó con cisplatino, después de una reducción de los puentes disulfuro con DTT, se demostró que las cisteínas libres presentan una reactividad muy superior a la de los grupos N-dadores (N-terminal, His). En caso de encontrarse implicadas las cisteínas en puentes disulfuro, la reactividad está disminuida, siendo comparable a la de otros aminoácidos.

En cuanto a la metodología analítica de la preparación de la muestra, se demostró la posibilidad de acelerar la digestión triptica de los aductos cisplatino-proteína mediante el empleo de una microsonda de ultrasonidos focalizados, permaneciendo el platino unido a los péptidos correspondientes. La información estructural fue similar, pero con un ahorro muy importante en el tiempo de digestión de 12 horas a 5 minutos.¹⁶

En la secuenciación de los péptidos con platino mediante ESI-MSⁿ se compararon las prestaciones de los métodos de fragmentación de péptidos mediante el método de fragmentación clásico, CID, y el más novedoso de disociación

por transferencia electrónica (ETD), aportando CID mejores resultados.¹⁶

Cuando se estudian proteínas de mayor masa que dan lugar a mezclas de péptidos más complejas, es necesaria la separación por HPLC previa a su análisis mediante ESI-MS/MS. Un ejemplo de los resultados obtenidos mediante el acoplamiento nLC-ESI-LIT-MS/MS se muestra en el cromatograma de la Figura 7, correspondiente a los aductos "mioglobina-cisplatino digeridos con tripsina".

Los estudios realizados con HSA y TF incubadas con cisplatino y análisis mediante ESI-Q-TOF muestran la formación de los aductos cisplatino-HSA de estequiometría 1:1 y cisplatino-Tf 1:1 y 1:2.⁷ Las digestiones tripticas de los aductos formados y análisis mediante μ HPLC-ICP-MS empleando una columna de fase inversa C₁₈ confirman la robustez del enlace cisplatino-proteína. El análisis estructural mediante μ HPLC-ESI-Q-TOF-MS permitió localizar péptidos con perfil isotópico de platino en cada uno de los digeridos. Resultados similares se obtuvieron con los digeridos de los complejos aislados de las muestras de suero sanguíneo incubadas con cisPt.

La metodología desarrollada en nuestro estudio, en principio se podría aplicar a la caracterización de complejos formados entre cualquier fármaco de platino y proteínas, y por extensión a cualquier metalodroga que forme complejos estables con biomoléculas.

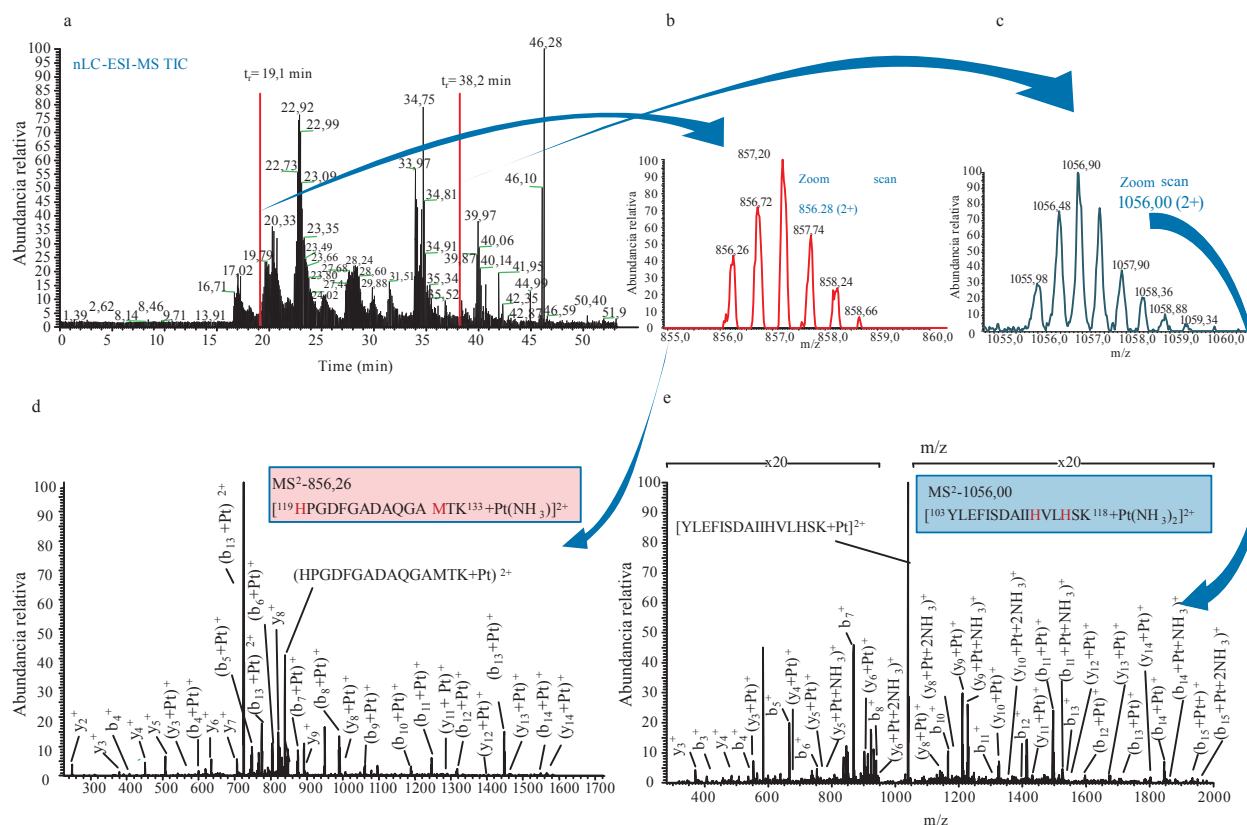


Figura 7. a) Cromatograma nLC-ESI-LTQ MS obtenido en modo TIC correspondiente a un digerido en disolución de aductos de mioglobina-cisplatino. A tiempos de retención de 19,1 min y 38,2 min se reconocieron sendos péptidos con platino a tenor de su perfil isotópico observado durante barridos en modo zoom, a m/z 856,28 (b) y a 1056,0 (c), respectivamente. Los espectros de fragmentación (CID-MS²) de estos iones permitieron su identificación y la localización de los puntos de unión del Pt en ellos (d y e), como los residuos de His y Met (marcado en rojo en su secuencia).

Separaciones multidimensionales de proteínas ligadas a platino

En muestras complejas, tales como extractos de células o tejidos, pueden encontrarse muchas proteínas ligadas al platino que no pueden ser separadas adecuadamente incluso mediante la combinación de procedimientos cromatográficos consecutivos. Además, la utilización de cromatografía en fase inversa, que puede proporcionar una gran resolución, puede no ser adecuada para muchas proteínas, que quedan retenidas irreversiblemente. Sin embargo, cuando se trabaja con péptidos, las posibilidades de separación y recuperación aumentan considerablemente. En este caso, la cromatografía en fase inversa es muy adecuada para su separación, obteniéndose recuperaciones generalmente muy buenas. Por esto, el análisis y caracterización de muestras muy complejas de proteínas tiende a hacerse actualmente después de su digestión triptica, tras la cual los péptidos producidos se separan mediante dos o más procesos cromatográficos siguiendo una metodología conocida como identificación de proteínas mediante separación multidimensional, MudPIT, en sus siglas en inglés.¹⁷

Una alternativa a las técnicas cromatográficas, es la electroforesis bidimensional (2-DE) aplicada directamente a los extractos de proteínas. La 2-DE consiste en dos separaciones electroforéticas ortogonales, la primera mediante isoelectroenfoque (IEF) y la segunda mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). La combinación de estas dos técnicas electroforéticas presenta un alto grado de resolución y puede utilizarse a escala micro-preparativa. Es así posible la separación e identificación de hasta centenares, e incluso miles de proteínas, por lo que es ampliamente utilizada en proteómica, siendo, en principio, una buena alternativa en metaloproteómica. No obstante, para la separación de proteínas unidas a platino, se hace necesaria la utilización de reactivos que no afecten a la integridad del enlace Pt-proteína. Algunos reactivos habitualmente utilizados para IEF o SDS-PAGE, como son la tiourea o los agentes reductores, deben restringirse o utilizarse con precaución.¹⁸ Los estudios se realizaron con proteínas modelo como la HSA, TF, citocromo C, anhidrasa carbónica y mioglobina incubadas con cisPt¹⁸ en un primer estudio de SDS-PAGE. Al finalizar la electroforesis, los minigeles (10 cm x 10 cm) se cortaron en pequeñas bandas de unos 15 x 7,5 mm, se digirieron con HNO₃ y H₂O₂, seguido de agua regia y HCl, y el contenido de platino se analizó por ICP-MS. Los mejores resultados se obtuvieron en condiciones no-reductoras (en ausencia de BME o DTT, donde las proteínas con platino se separan en bandas estrechas en el intervalo 0-3-2,0 µg, y las recuperaciones de platino son cuantitativas. Los límites de detección obtenidos (2,4-14 pg de Pt) son adecuados para su aplicación a muestras biológicas. Estudios paralelos realizados con carbo- y oxaliplatino en las condiciones seleccionadas anteriormente aportaron resultados similares en el caso del oxaliplatino. Sin embargo, el carboplatino muestra pérdidas significativas del platino unido a las proteínas, por lo que las separaciones electroforéticas de las proteínas ligadas a este fármaco se han de realizar en condiciones nativas.

En el segundo estudio, sobre las proteínas separadas por SDS-PAGE se realizan de forma secuencial procesos de fijación, tñido y destñido del gel y se realiza la digestión triptica

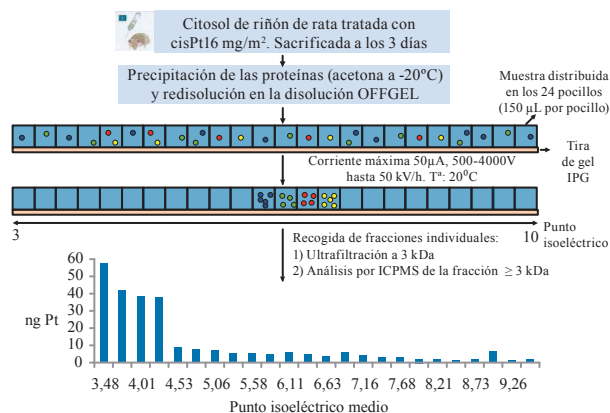


Figura 8. Esquema de la separación mediante isoelectroenfoque OFFGEL en condiciones no reductoras de un citosol de riñón. Perfil de Pt proteico obtenido mediante análisis ICP-MS de las fracciones líquidas recogidas.

in-gel de las bandas seleccionadas. Los resultados obtenidos para los digeridos *in-gel* de las proteínas seleccionadas incubadas con cisplatino y analizadas por nHPLC-ESI-MS/MS indican que el proceso de digestión *in-gel* es también adecuado para mantener los enlaces Pt-proteína, y por tanto para la caracterización estructural de estos complejos y sus puntos de unión.^{18,19}

Recientemente se ha desarrollado una nueva técnica de isoelectroenfoque en disolución (sIEF, conocida como OFFGEL IEF), en la cual las proteínas separadas se recogen en disolución en unos pocillos situados encima de la tira de gel IEF. La ventaja es que mediante este procedimiento se simplifica el tratamiento de la muestra para su análisis posterior mediante nLC-ESI-MS. Los ensayos OFFGEL IEF realizados con proteínas modelo ligadas a cisplatino muestran buenas separaciones y recuperaciones cuantitativas prescindiendo del uso de tiourea y en condiciones no reductoras.¹⁸ Por otra parte, se ha demostrado la utilidad del OFFGEL IEF para la separación de proteínas de citosoles de riñón de ratas tratadas con cisplatino.¹⁸ Se observa que el platino no se distribuye de forma uniforme a través de los 24 pocillos del sistema, sino que la mayor parte del platino ligado a proteínas se localiza en 4 pocillos (Figura 8), lo que facilita la posterior identificación estructural mediante nLC-ESI-MS/MS de las fracciones enriquecidas en platino.

Distribución de las proteínas unidas a platino mediante el análisis de geles de electroforesis por LA-ICP-MS

La combinación de la electroforesis, SDS-PAGE o 2D, con ablación láser (LA) acoplada a ICP-MS, LA-ICP-MS, es una herramienta muy prometedora para la obtención de los mapas de distribución de metales o heteroátomos ligados a proteínas, habiéndose aplicado con éxito a la detección de proteínas fosforiladas²⁰ o ligadas a Zn o Cd.²¹ En nuestro caso, el empleo de las técnicas 2-DE (IEF seguido de SDS-PAGE) junto con LA-ICP-MS permite el aislamiento y localización rápida y precisa de las bandas (1D) o puntos (2D) donde se encuentren las proteínas ligadas a platino. Posteriormente los trozos de gel que contienen Pt pueden cortarse, digerirse con tripsina, y las proteínas platinadas identificarse mediante nLC-ESI-MS/MS de los péptidos producidos (Figura 9).

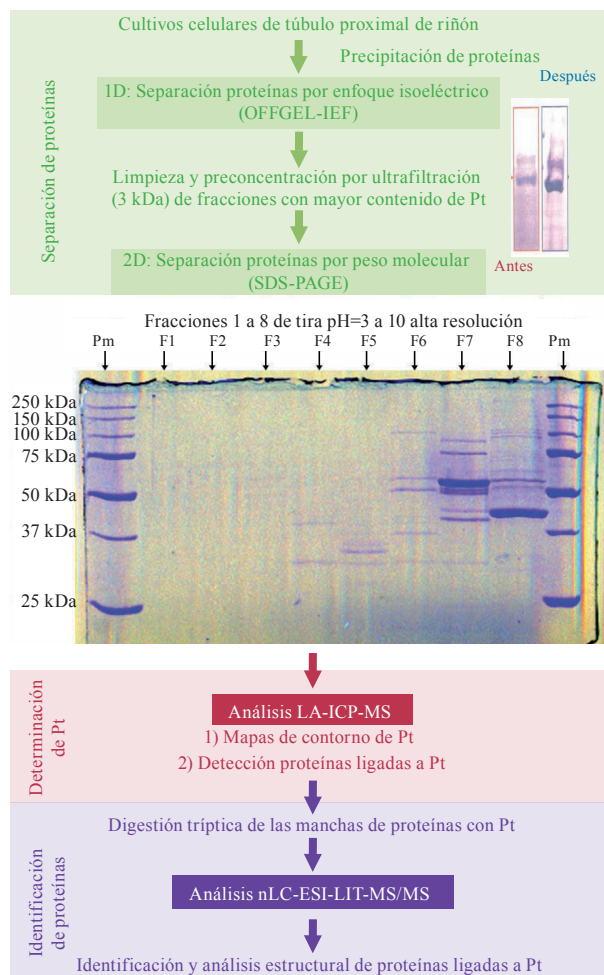


Figura 9. Esquema de la separación de proteínas citosólicas por electroforesis bidimensional, detección de las bandas con Pt por LA-ICP-MS e identificación estructural de las proteínas ligadas a Pt mediante nLC-ESI-LIT-MS/MS. Los intervalos de pH de las diferentes fracciones son: F1 (3,35-3,61), F2 (3,61-3,88), F3 (3,88-4,14), F4 (4,14-4,40), F5 (4,40-4,66), F6 (4,66-4,93), F7 (4,93-5,19) y F8 (5,19-5,45).

La aplicabilidad de esta metodología a proteínas ligadas a platino se ha evaluado primero con una mezcla de proteínas incubadas *in vitro* con cisplatino y a continuación con citosoles de cultivos de células epiteliales del túbulo proximal de riñón (RPTECs) de cerdo en miniatura incubados con cisplatino. Con objeto de obtener la distribución de las proteínas con platino en el gel y su abundancia relativa, se crearon mapas de contorno de platino mediante el programa MATLAB. Se observa, como era de esperar, que no aparece platino en todas las manchas donde hay proteínas, y que la intensidad de la señal de platino es independiente de la concentración de proteína, lo que indica cierta especificidad del fármaco en sus interacción con las proteínas.²² Estos resultados son muy prometedores en términos de selectividad, sensibilidad y rapidez del análisis.

Conclusiones

Los avances logrados en los últimos años en análisis bio-inorgánico han permitido abordar estudios metalómicos *in vivo* de fármacos de platino. El empleo de

técnicas de separación cromatográficas y electroforéticas en combinación con técnicas de espectrometría de masas atómica y molecular constituyen herramientas complementarias para la detección e identificación sensible y selectiva de los complejos fármaco-proteína formados en los medios biológicos y muestras clínicas durante el tratamiento. Cabe esperar que en un futuro este tipo de estrategias sean de gran ayuda en estudios de distribución, metabolismo, efectos tóxicos, etc. de metalodrogas en general.

Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación recibida del Ministerio de Ciencia e Innovación en el proyecto CTQ2008-04873.

Bibliografía

- Y. Jung, S. J. Lippard, *Chem. Rev.* **2007**, *107* (5) 1387–1407.
- R. C. Todd, S. J. Lippard, *Metallomics*. **2009**, *1*, 280–291.
- K. Wang, J. Lu, R. Li, *Coord. Chem. Rev.* **1996**, *151*, 53–88.
- E. Cvitkovic, *Cancer Treat. Rev.* **1998**, *24*, 265–281.
- J. Cassidy, *Int. J. Clin. Pract* **2000**, *54*, 399–402.
- J. Peng, R. Mandal, M. Sawyer, X. F. Li, *Clin. Chem.* **2005**, *51* (12), 2274–2281.
- D. Esteban-Fernández, M. Montes-Bayón, E. Blanco-González, M. M. Gómez-Gómez, M. A. Palacios, A. Sanz-Medel, *J. Anal. Atom. Spectrom.* **2008**, *23*, 378–384.
- D. Esteban-Fernández, B. Cañas, I. Pizarro, M. A. Palacios, M. M. Gómez-Gómez, *J. Anal. At. Spectrom.* **2007**, *22*, 1113–1121.
- J. Szpunar, *The Analyst (CR)* **2005**, *130* (4), 442–465.
- D. Esteban-Fernández, E. Moreno-Gordaliza, B. Cañas, M. A. Palacios, M. M. Gómez-Gómez, *Metallomics*. **2010**, *2*, 19–38.
- C. Casiot, J. Szpunar, R. Lobinski, M. Potin-Gautier, *J. Anal. At. Spectrom.* **1999**, *14*, 645–650.
- A. Rodríguez-Cea, M. R. Fernández de la Campa, E. Blanco-González, B. Andón-Fernández, A. Sanz-Medel, *J. Anal. At. Spectrom.* **2003**, *18*, 1357–13664.
- D. Esteban-Fernández, M. M. Gómez-Gómez, B. Cañas, J. M. Verdaguer, R. Ramírez, M. A. Palacios, *Talanta* **2007**, *72*, 768–773.
- D. Esteban-Fernández, J. M. Verdaguer, R. Ramírez, M. A. Palacios, M. M. Gómez-Gómez, *J. Anal. Toxicol* **2008**, *32* (2), 140–146.
- E. Moreno-Gordaliza, B. Cañas, M. A. Palacios, M. Gómez-Gómez, *Anal. Chem.* **2009**, *81* (9), 3507–3516.
- E. Moreno-Gordaliza, B. Cañas, M. A. Palacios, M. M. Gómez-Gómez, *Analyst* **2010**, *135* (6), 1288–1298.
- QC Ru, LA Zhu, RA Katenhusen, J. Silberman, M. Liebman, CD Shriver, *J. Chromatogr. A.* **2006**, *1111*, 175.
- M. L. Mena, E. Moreno-Gordaliza, I. Moraleja, B. Cañas, M. M. Gómez-Gómez, *J. Chromatogr. A.* **2011** *1218* (9), 1281–1290.
- E. Moreno-Gordaliza, B. Cañas, M. A. Palacios, M. M. Gómez-Gómez, *Talanta*, **2012**, *88*, 599–608.
- A. Ventachalam, C. U. Koehler, I. Feldmann, P. Lampen, A. Manz, P. H. Roos, N. Jakubowski, *J. Anal. At. Spectrom.* **2007**, *22*, 1023–1032.
- M. R. B. Binet, R. Ma, C. W. McLeod, R. K. Poole, *Anal. Biochem.* **2003**, *318* (1) 30–38.
- E. Moreno-Gordaliza, D. Esteban-Fernández, C. Giesen, K. Lehmann, A. Lázaro, B. Cañas, A. Tejedor, C. Scheler, N. Jakubowski, M. W. Linscheid, M. Gómez-Gómez, *Proceedings of the European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, Zaragoza (Spain)*, **2011**, *114* (OC-53).